

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-319317

(43)公開日 平成8年(1996)12月3日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 08 F 212/14	M J Y		C 08 F 212/14	M J Y
C 12 M 3/00			C 12 M 3/00	A
C 12 N 5/06			G 01 N 33/53	Y
// G 01 N 33/53		9281-4B	C 12 N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全9頁)

(21)出願番号 特願平8-59693
(22)出願日 平成8年(1996)3月15日
(31)優先権主張番号 特願平7-59573
(32)優先日 平7(1995)3月17日
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 591243103
財団法人神奈川科学技術アカデミー
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
(72)発明者 由良 洋文
神奈川県藤沢市湘南台5-9-1-601
(72)発明者 後藤 光昭
神奈川県川崎市中原区上小田中221 光八
イツB203
(72)発明者 赤池 敏宏
東京都保谷市下保谷4-15-23
(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

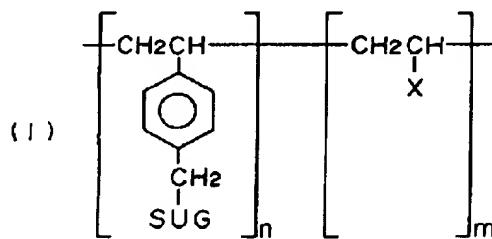
(54)【発明の名称】 糖鎖高分子及びそれを用いた細胞処理剤並びに処理方法

(57)【要約】

【課題】 糖鎖による細胞選択性に加えて、第2の作用を付加した糖鎖高分子を提供する。

【解決手段】 下記式(1)で表される、糖鎖(SU)
G)含有スチレン誘導体と、少なくともひとつの第2の作用を有する部位(X)を含有するビニル系モノマーとの共重合体からなる糖鎖高分子。

【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖鎖含有スチレン誘導体と、少なくともひとつの第2の作用を有する部位を含有するビニル系モノマーとの共重合体からなることを特徴とする糖鎖高分子。

【請求項2】 前記ビニル系モノマーが含有する第2の作用を有する部位が、ビタミン類、薬物、サイトカイン、増殖因子、フラボノイド、核酸、ペプチドから選択される少なくともひとつからなることを特徴とする請求項1記載の糖鎖高分子。

【請求項3】 前記第2の作用を有する部位が、RGD SGペプチドである請求項2の糖鎖高分子からなることを特徴とする細胞認識剤。

【請求項4】 前記ビニル系モノマーが含有する第2の作用を有する部位が、前記糖鎖を特異的に認識する細胞に対して非特異的に作用することを特徴とする請求項1記載の糖鎖高分子。

【請求項5】 前記第2の作用を有する部位が、酸性多糖類とコンプレックスを形成する塩基性基であることを特徴とする請求項4記載の糖鎖高分子。

【請求項6】 請求項5の糖鎖高分子と酸性多糖類とのコンプレックスからなるゲル状の細胞培養基質。

【請求項7】 請求項6の細胞培養基質を粒子状に加工し、その粒子内で細胞を培養することからなる細胞培養法。

【請求項8】 前記第2の作用を有する部位が、温度感受性基である請求項4の糖鎖高分子からなることを特徴とする細胞回収剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、糖鎖高分子に関し、特に細胞に選択的に認識される糖鎖を有し、なおかつ第2の作用を有する成分を附加した糖鎖高分子、並びにその糖鎖高分子を用いた細胞処理剤及び処理方法に関する。ここで、本発明における細胞処理剤とは、細胞培養基質、細胞をカプセル化する細胞カプセル化剤、または細胞回収剤といった細胞に種々の処理を行う薬剤すべてを含むものとする。

【0002】

【従来の技術】 近年の糖鎖工学の進歩には目ざましいものがある。例えば、糖鎖を有する生体高分子としては、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、及び細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等が挙げられるが、これらの高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。

【0003】 さらに、このような糖鎖と細胞の分化増殖、細胞接着、免疫、及び細胞の癌化との関係が明確に

されれば、この糖鎖工学と、医学、細胞工学、あるいは臓器工学とを密接に関連させて新たな展開を図ることが期待できる。

【0004】 その一例として、細胞表面の糖鎖や、糖鎖レセプター間の相互作用異常による疾病的発生、あるいはエイズなどのウイルス感染における糖鎖の役割等に関する研究が活発化してきている。また、細胞-細胞間相互作用、細胞-マトリックス間相互作用における糖鎖の関与に関する研究も、生体反応を理解する上で重要な

10 なってきている。

【0005】 各種細胞による糖鎖認識の特異性について例示すると、肝実質細胞はガラクトース (Gal) やマノース (Man) を選択的に認識するのに対し、肝非実質細胞はMan、グルコース (Glc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に対する親和性が高い。血清組織はMan、GlcNAc、及びN-アセチルマンノサミン (ManNAc) を、リンパ組織はManNAc 及びGlcNAc を特異的に認識する。

【0006】 また、各種細胞表面に存在するマクロファ

20 ージ上のアシアロ糖タンパク質やレクチン様タンパク質等の糖鎖認識タンパク質も、各々選択的に糖鎖を認識する。例えば、肺胞マクロファージ上の分子量175Kのタンパク質は、Man、フコース (Fuc)、及びGlcNAc を、腹腔マクロファージ上の分子量180Kのタンパク質はMan、Fuc、及びGlcNAc を、ラットクッパー細胞上の分子量30Kのタンパク質、腹腔マクロファージ上の分子量42Kのタンパク質、及び活性化マクロファージ上の分子量45~60Kのタンパク質はGal 及びN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を、各々特異的に認識する。

【0007】 本発明者らは、従来から糖鎖の特異的な親和力に着目し鋭意研究を行ってきており、例えば、アシアロ糖タンパク質レセプターに対するリガンドのモデルとして、ガラクトースを側鎖に有する高分子であるポリ (N-*p*-ビニルベンジル-[O- β -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 4)-D-グルコンアミド]) (PVLAと略記) を設計・合成した。例えば、このPVLAを固定化したシャーレ上での肝細胞培養実験において、PVLAと肝実質細胞表面のアシアロ糖レセプターとの特異的親和力を介して肝実質細胞が選択的に接着され、しかもその接着形態が特異的であって三次元の細胞集合体が導かれることを見いだした。(「糖鎖工学と人工臓器」赤池敏宏ら、日経サイエンス、114~129頁、1994年)

40 【0008】 また、生体は、糖鎖以外にも細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響する他の因子を備え、それらが複合的に作用して精密な生体制御が達成されている。さらに、生体外にも、それらに影響を与える因子が存在する。そこで本発明者らは、上記のような細胞選択性を付与する糖鎖を含む高分子に、生体内あるいは生体外に

由来する第2の作用を付加するべく研究を行い本発明をなすに至った。

【0009】

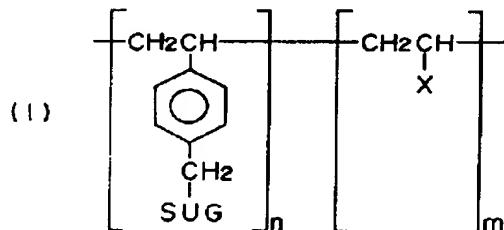
【発明が解決しようとする課題】従って本発明における課題は、細胞によって特異的に認識される糖鎖を利用した細胞選択性に加えて、その特異的に選択された細胞を増殖、分化させたり、その細胞に種々の処理を施す上で有効な第2の作用を付加した糖鎖高分子を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】かかる課題は、糖鎖含有スチレン誘導体と、少なくともひとつの第2の作用を有する部位を含有するビニル系モノマーとの共重合体からなる糖鎖高分子によって解決できる。即ち、本発明の糖鎖高分子は、下式(1)に示すように、p-置換スチレン誘導体のベンジル位に糖鎖(SUG)を結合させた糖鎖含有モノマーと、第2の作用を有する部位(X)を結合させたビニル系モノマーとの共重合体である。

【0011】

【化1】



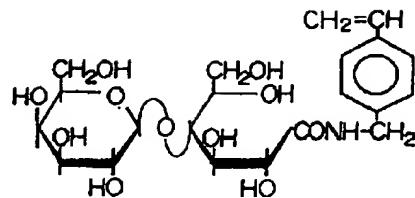
【0012】

【発明の実施の形態】本発明の糖鎖高分子をなす糖鎖含有モノマーは、スチレン誘導体のp-ベンジル位に糖鎖(SUG)を結合させたモノマーである。この糖鎖としては、グルコース、ガラクトース、ラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、ラミナリビオース、ウロン酸関連物質、硫酸糖等の单糖類、オリゴ糖類等がいずれも使用でき、これらのモノマーを重合して得た糖鎖高分子の側鎖として結合した状態で、細胞と特異的相互作用する糖残基を保持できるものならば、特に限定されるものではない。

【0013】これらの糖鎖含有モノマーにおけるスチレン誘導体と糖鎖との結合方法は、アミド結合、エーテル結合、エステル結合等の共有結合とするのが好ましい。これらの糖鎖含有モノマーは、例えば、p-アミノメチルスチレンのアミノ基と、ラクトン化した糖の末端カルボニル基間でアミド結合を形成させることにより合成することができる。このような糖鎖含有モノマーの中でも、例えば、下記式(2)から(11)で表される糖鎖含有モノマーが特に好適に用いられる。

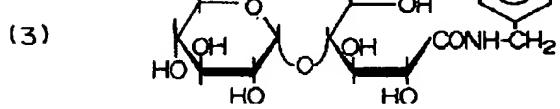
【0014】

【化2】



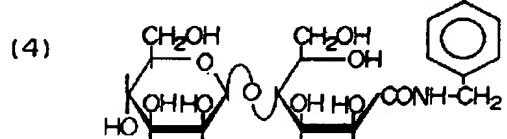
* 【0015】

【化3】



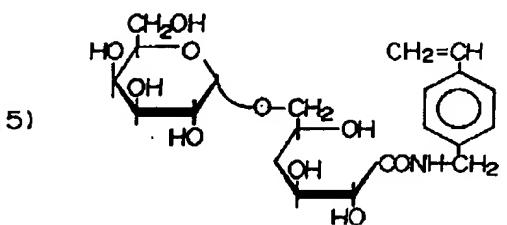
【0016】

【化4】



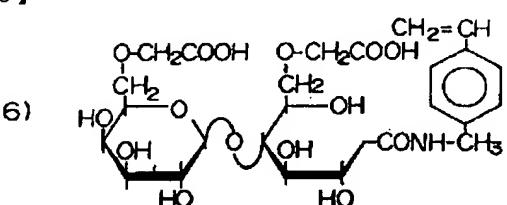
【0017】

【化5】



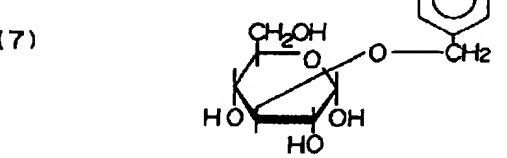
【0018】

【化6】



【0019】

【化7】



* 【0020】

【化8】

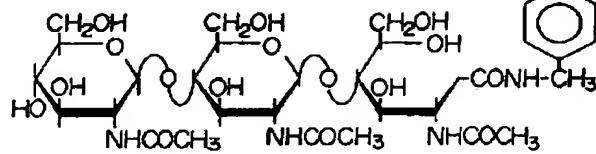
5

(4)

6

5

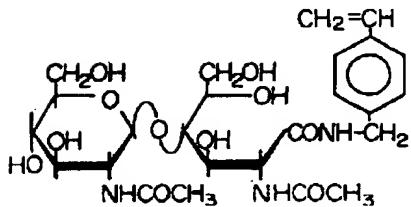
(8)



【0021】

【化9】

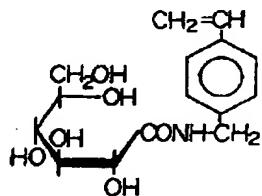
(9)



【0022】

【化10】

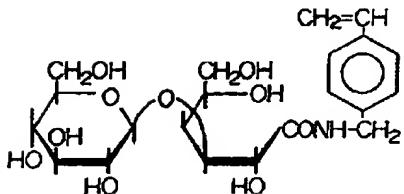
(10)



【0023】

【化11】

(11)



【0024】上記式(2)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O- β -D-ガラクトピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド] (以後、VLAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーであり、 β -ガラクトース残基を有する。

【0025】上記式(3)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O- α -D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド] (以後、VMAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとマルトースとから合成されたモノマーであり、グルコース残基を有する。

【0026】上記式(4)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O- β -D-マンノピラノシル-(1→4)-D-マンナミド] (以後、VManと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとマンノビオースとから合成されたモノマーであり、マンノース残基を有する。

【0027】上記式(5)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O- α -D-ガラクトピラノシル-(1→6)-D-グルコンアミド] (以後、VMeAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとO- α -D-ガラクトピラノシル-(1→6)-D-グルコースとから合成されたモノマー

であり、 α -ガラクトース残基を有する。

【0028】上記式(6)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O-6-カルボキシメチル- β -D-ガラクトピラノシル-(1→4)-O-D-6-カルボキシメチル-グルコンアミド] (以後、VLACOOHと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーをカルボキシメチル化して得られるもので、カルボキシメチル化- β -ガラクトース残基を有する。

【0029】上記式(7)で表される3-O-4'-ビニルベンジル-D-グルコース (以後、VGと略記する)は、p-クロロメチルスチレンとグルコースとから合成されたモノマーであり、グルコース残基を有する。

【0030】上記式(8)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]、上記式(9)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]、またはそれらの混合物 (以後、いずれもVG 1c Na cと略記する)は、ともにN-アセチルグルコサミン残基を有する。

【0031】上記式(10)で表されるN-p-ビニルベンジル-D-グルコンアミド (以後、VGAと略記する)は、D-グルコースを開環させてp-アミノメチルスチレンと結合させたモノマーである。

【0032】上記式(11)で表されるN-p-ビニルベンジル-[O- β -D-グルコピラノシル-(1→3)-D-グルコンアミド] (以後、VLamと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラミナリビオースとから合成されたモノマーであり、 β 1→3グルコース残基を有する。

【0033】このようなポリスチレン誘導体に糖鎖を結合させた糖鎖含有モノマーを重合させて得られる糖鎖高分子は、ポリスチレン誘導体を主鎖とし、その主鎖に糖鎖が側鎖として結合した形状をなしている。従って、この糖鎖高分子は、水中において、ポリ疎水性のスチレン主鎖をコアとし、その周囲を親水性の糖鎖が囲んだ安定なミセルを形成して溶解する。

【0034】一方、式(1)に示した本発明の糖鎖高分子をなすビニル系モノマーは、その側鎖に第2の作用を有する部位(X)を含有している。この第2の作用とは、前記糖鎖を特異的に認識する細胞に対して、その細

50

胞の接着、増殖、または分化等の機能に直接影響を与える作用を含んでおり、そのような作用を有する部位としては、ビタミン類、薬物、サイトカイン、増殖因子、フラボノイド、核酸、ペプチド、及びホルモンから選択される少なくともひとつからなるものが好ましく、それらの作用を保持した状態でビニル系モノマーに結合されている。

【0035】ここで、ビタミン類とは、ビタミンA、D、E、及びK等の脂溶性ビタミン、ビタミンB群やビタミンC等の水溶性ビタミン、リボフラビン（ビタミンG）、またはビオチン（ビタミンH）等のすべてのビタミン、さらに、ユビキノン、リポ酸等のビタミン様作用因子を含むものとする。

【0036】例えば、肝細胞に特異的なガラクトース残基を有する前記式（2）の糖鎖含有モノマーであるVLAと、ビタミンの一種であるビオチンを側鎖に有するビニル系モノマーとを共重合させた糖鎖高分子は、肝実質細胞や肝癌細胞であるHepG2に対して、VLAのみからなる糖鎖高分子よりも大きな相互作用を有することが確認されており、ビオチンという第2の作用を有する部位を導入した糖鎖高分子は、例えば、肝細胞の癌化を識別する診断試薬として使用できる。

【0037】薬物とは、細胞の接着、増殖、分化等の機能に作用する薬物であれば、特に限定されるものではない。例えば、膵臓のランゲルハンス島の β 細胞からのインスリン分泌に関与するK⁺チャネルを制御する脂溶性薬物であるスルホニルウレア構造を側鎖に有するビニル系モノマーを、前記V B-L Aと共重合させた糖鎖高分子は、膵臓 β 細胞より誘導されたインスリン分泌能の高いトランシジェニックマウス由来のインスリノーマMIN6細胞のインスリン放出に影響を与えることが確認されている。即ち、この糖鎖高分子は、例えば、インスリン放出調整剤として使用できる。

【0038】増殖因子とは、上皮細胞成長因子、纖維芽細胞成長因子、ソマトメジン、T細胞成長因子等のすべての増殖因子を含むものとし、フラボノイドとは、フラボン、フラボノール、フラバノン、カテキン、カルコン等のすべてのフラボノイドを含み、核酸は、DNA及びRNA、あるいはそれらと類似の構造を持つ高分子物質をも含むものとする。

【0039】また、肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質レセプターに特異的なガラクトース残基を有する前記VLAと、やはり肝細胞表面のレセプターであるインテグリンファミリーに特異的に認識されるRGDSG（アルギニン・グリシン・アスパラギン酸・セリン・グリシン）ペプチドを側鎖に有するビニル系モノマーとを共重合させて得た糖鎖高分子は、肝細胞上の各々のレセプターに特異的に認識されることが確認されており、このような多点認識性糖鎖高分子は、高精度で高感度な細胞識別剤に応用できる。

(5) 8

【0040】本発明にあっては、前記第2の作用が、その糖鎖を特異的に認識する細胞に対して非特異的に作用するものであってもよい。ここで、「非特異的に作用する」とは、第2の作用を有する部位が、その細胞の接着、増殖、分化等に対して直接特異的に作用はしないが、その第2の作用によって、例えば、その細胞の周囲の環境や立体配置を変化させたり、糖鎖高分子自身の物理化学的特性を変化させたりすることにより、その細胞に間接的に影響を及ぼすことを意味するものとする。

10 【0041】このような非特異的に作用する第2の作用性部位含有ビニル系モノマーの一例として、イソプロピルアクリルアミド等の温度感受性基を有するモノマーが挙げられる。これを重合した高分子は、約32℃以上では脱水和して疎水性高分子として振る舞い、それ以下では水和して親水性高分子として挙動するという温度感受性を有している。したがって、上記の糖鎖含有モノマーと、温度感受性基含有モノマーとを共重合させて得られた糖鎖高分子は、一定温度以上では疎水性を有し、それ以下では親水性となる。

20 【0042】例えば、その糖鎖に特異的な細胞を分散した水性分散液を一定温度以下に保ったまま前記糖鎖高分子を加えると、親水性の糖鎖高分子は溶解して分散された細胞が糖鎖に特異的に結合する。次に、水温を一定温度以上に上昇させると、細胞と結合した糖鎖高分子は疎水性となって沈降する。よって、本発明の糖鎖高分子は、目的とする細胞を選択的に回収できる細胞回収剤として使用することができる。

【0043】また、アミノ基等の塩基性基を含有するビニル系モノマーも、上記の非特異的に作用する第2の作用性部位含有ビニル系モノマーの一例である。アミノ基等の塩基性基は、ゲル形成能を有するアルギン酸等の酸性多糖類と容易にコンプレックスを形成する。したがって、このような塩基性基含有モノマーと糖鎖含有モノマーとを共重合させた糖鎖高分子と酸性多糖類とのコンプレックスでゲルを形成することにより、糖鎖を含有し、3次元的構造を有する細胞培養基質を得ることができる。

40 【0044】「3次元的構造」とは、細胞培養基材表面をコラーゲンのような細胞接着物質で被覆するような従来の2次元的構造とは異なり、細胞の特異的接着機能を有する糖鎖を、3次元的に分布させた構造体を意味するものとする。そのような3次元構造を有するゲル状の細胞培養基質上で、その糖鎖に特異的な細胞を培養することにより、形成される細胞凝集体の立体構造を制御することが可能になる。

【0045】さらには、上記の糖鎖高分子と酸性多糖類とで形成されるゲルで造粒することにより、細胞を粒子という閉鎖された環境で培養することが可能になり、過剰な細胞の凝集体形成を防止し、適度にコントロールされた凝集体形成をすることができる。このような立体構

造を制御した細胞培養は、特に肝細胞培養において重要であり、生体由来の肝細胞を培養して使用するハイブリッド型人工肝臓への応用が可能である。

【0046】以上、特にVLAのガラクトース残基と肝細胞との特異的親和性を利用した例について説明したが、本発明はこれらに限られるものではなく、種々の応用を含んでいます。即ち、本発明の糖鎖高分子は、上述したような糖鎖含有モノマーと、第2の作用性部位含有ビニル系モノマーとを共重合させてなることを特徴とするものであって、糖鎖により細胞の特異的認識性が付与され、さらにビニル系モノマーの作用性部位によって様々な第2の作用が付加されている。

【0047】本発明の糖鎖高分子にあっては、糖鎖と第2作用性部位との組み合わせは自由であり、選択的に処理すべき細胞と、なすべき処理に応じて適宜選択できる。また、それらの組成割合は、選択性の強さや目的により適宜選択すればよく、特に限定されるものではない。さらに、2種以上の糖鎖含有モノマー及び/または2種以上の作用性部位含有ビニル系モノマーを組み合わせて共重合させた糖鎖高分子も本発明の範囲内であることは言うまでもない。

【0048】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明の糖鎖高分子をさらに具体的に説明する。

(実施例1) ビオチンのヒドロキシサクシンイミドエステル1.92g (7.9mmol) とビニルベンジルアミンとをDMF 20mlに溶解し、これを窒素気流下37℃で24時間反応させた。反応終了後、ろ過し、ろ液に200mlのエーテルを加えて放置し、生じた沈殿をろ別した。ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムにて精製して目的とする第2の作用部位含有ビニルモノマーであるビニルベンジルビオチンアミド (VBA) 2.1gを得た (収率82%)。また、糖鎖含有モノマーとして上記式(2)のVLAを合成した。

【0049】上記VLAとVBAとを、仕込モル比90:10で共重合させた。即ち、VLA 1.77g (3.7mmol) とVBA 0.15g (0.42mmol) を2mlのDMSOに溶解し、開始剤 (AIBN) を添加して、重合用ガラスアンプル中で重合させて糖鎖高分子を得た。同様に、仕込モル比を80:20とした糖鎖高分子 (P (VLA-co-VBA) と略記)、及びVLAの代わりに上記式(3)のVMAを用い、仕込モル比を80:20とした糖鎖高分子 (P (VMA-co-VBA) と略記) を合成した。比較のため、前記VLA及びVMAの単独重合体であるPVLA及びPVMAを合成し、各高分子に、VLAまたはVMA 120単位当たり1個の割合でFITCを導入して蛍光標識した。

【0050】各高分子を、その濃度が0.1%、0.01%、及び0.001% (W/V) となるように、ビオチ

ンを含まない培地に溶解した高分子溶液を作製した。ただし、各濃度における各高分子溶液間の蛍光量に差が無くなるように、蛍光標識した高分子と蛍光標識していない高分子とを混合して調整した。

【0051】癌細胞 (Hep G2) を、10%ウシ胎児血清 (FCS)、0.07g/1ペニシリンGカリウム、0.01g/1ストレプトマイシン硫酸を添加したヴィリアムス媒質E (バッファA) で、親水性ボトル (Falcon3045) を用いて継代培養した。継代培養3日目に、培養液を捨てた後、細胞表面をPBS (-) 液で洗浄し、トリプシン溶液 (0.25% トリプシン、0.02% EDTAを溶解したハンクス液) 8mlを加え、CO₂下37℃で2分間インキュベートした。FCS添加培地を加えてピッティングした後、細胞を回収し、800rpmで1分間遠心処理した。この処理を数回繰り返して細胞を洗浄した後、細胞数100万個となるようにチューブに分注した。

【0052】上記チューブに各濃度の高分子溶液を10μlずつ加え、攪拌後37℃と4℃で45分間処理した。反応の途中は、15分おきに攪拌を行い、最終的にNa₃N₃を含むPBS (+) を加えた。同溶媒で2回洗浄した後、フローサイトメトリーによる解析を行った。高分子濃度0.01%のときの結果を図1に示す。

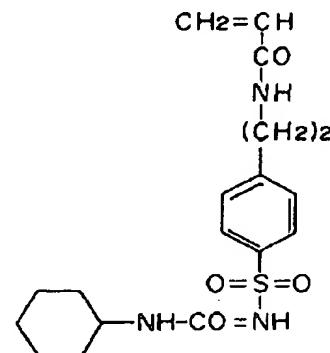
【0053】Hep G2は、グルコース残基を有するVMA系糖鎖高分子よりも、ガラクトース残基を有するVLA系糖鎖高分子に対する認識性が高く、ビオチンが共存する糖鎖高分子に対する認識性はさらに高くなった。即ち、Hep G2は、ガラクトース及びビオチンのいずれをも認識して相互作用しており、このことから、VLAに加えて第2成分であるビオチンを含む糖鎖高分子を用いることにより、癌化した細胞であるHep G2をより明確に識別できることが明らかになった。

【0054】(実施例2) 糖鎖含有モノマーとして上記式(2)のVLA及び式(3)のVMAを合成し、第2の作用部位を有するビニル系モノマーとして、下記式(12)で表されるスルホニルウレア構造含有ビニルモノマーを合成した。

【0055】

【化12】

(12)



【0056】上記スルホニルウレア構造含有ビニルモノマーは、次のようにして合成した。まず、p-アミノエチルベンゼンスルフォンアミド(1g、5mmol)をアセトン5ml及び1NのNaOH水溶液5mlの混合溶液に溶解させ、アクリロイルクロライドの0.54g(6mmol)を加えて室温で3時間反応させた。溶媒を留去後、メタノールに溶解し、不溶物を濾別した。これをメタノールから3回再結晶を行って、4-

[(2')-アクリルアミドエチル]ベンゼンスルホニルアミド(AEBSA)を得た(収率80%)。

【0057】AEBSAの1.7g(7mmol)を3.5mlのアセトンに分散させた後、1NのNaOH水溶液7mlを加えて溶解した。これに3.5mlアセトンに溶解したシクロヘキシルイソシアネート(0.876g、7mmol)を添加した。16時間反応させた後、1NのHCl水溶液7mlを添加し、沈澱を濾取後、水で十分に洗浄した後、メタノールから再結晶し、上記式(12)で示すシクロヘキシル4-[(2')-アクリルアミドエチル]ベンゼンスルホニルウレア(CAEBSU)を得た(収率75%)。

【0058】VLAとCAEBSUとの仕込みモル比9:1の糖鎖高分子は、1.7gのVLAと、0.13gのCAEBSUとを、2mlのDMSOに溶解させ、AIBN2mgを添加した後、60℃で6時間反応させることにより得た。

【0059】同様にして、VLAまたはVMAと、CAEBSUとを、各々仕込みモル比7:3で共重合させて糖鎖高分子を得た(P(VLA-co-SU)、及びP(VMA-co-SU)と略記)。これら各々の糖鎖高分子の水溶液(0.1%)1.5mlをポリスチレン製シャーレに添加して放置することにより被覆した。比較のため、PVLA及びPVMAで被覆したシャーレも作製した。

【0060】トランスジェニックマウス由来のインスリノーマMIN6細胞を、2×10⁵個/mlに調整し、その1.5mlずつを、上記各高分子で被覆したシャーレに播種した。37℃、5%CO₂下で所定時間培養した後、培地を採取し、培地に含まれるインスリン量をエンザイムイムノアッセイ(EIA)で測定した。MIN6細胞播種後、24時間のインスリン産生量を表したのが図2である。図2中、「対照」とは未被覆のポリスチレン製シャーレで培養したときの結果である。

【0061】対照と比較し、グルコース残基を有するPVMA及びP(VMA-co-SU)の系ではインスリン産生量の増加がみられ、特に、P(VMA-co-SU)の系で最大の産生量が得られた。このことから、MIN6細胞がグルコースを認識し、さらにスルホニルウレアを認識することによって、それらとの相互作用がインスリン産生量を増大させたことをが明らかに示唆された。

【0062】(実施例3) 糖鎖含有モノマーとして上記

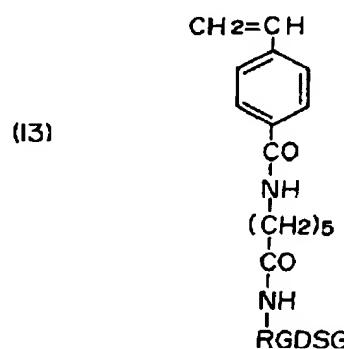
式(2)のVLAを合成した。RGDSGペプチドは、市販の化合物、またはSheppard's Fmoc改良法でバイオテック・ペプチド・シンセサイザ(BioTech Peptide Synthesizer)によって合成したものを用いた。

【0063】P-ビニル安息香酸4g(27mmol)を、3.5g(30mmol)のN-ヒドロキシサクシニミドとN,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド6g(30mmol)とともにクロロホルム10mlに溶解し、室温で24時間反応させた。溶媒を留去後、得られた沈澱をクロロホルム・エーテルから再結晶した(収量2.7g)。

得られた活性エステル(1.5g(6mmol))を6-アミノ-N-カプロン酸0.8g(6mmol)とともにTHFに溶解し、室温で4日間反応させた。溶媒を留去後、クロロホルムから再結晶して、6-(p-ビニルベンズアミド)-ヘキサン酸を得た。

【0064】VLA1g(2.1mmol)と6-(p-ビニルベンズアミド)-ヘキサン酸61mg(0.21mmol)を3mlのDMSOに溶解し、2mgのAIBNを添加し、60℃で24時間共重合させた。得られた共重合体100mgをテトラメチルエチレンジアミン緩衝液(TEMED、50mM、pH4.7)10mlに溶解し、1-エチル-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド0.063g(2.2mmol)を加えて室温で24時間反応させた。得られた活性化高分子に、RGDSGペプチド0.117g(2.2mmol)を加えて室温で3日間反応させ、第2の作用部位としてRGDSGペプチドを有する下式(13)で表されるモノマーとVLAとの共重合体からなる糖鎖高分子(P(VLA-co-RGDSG)と略記)を合成した。

【0065】
【化13】



【0066】P(VLA-co-RGDSG)及びPVLAの0.01%水溶液(w/v)を各々シャーレ(Falcon1008)に添加し、24時間放置後PBSで洗浄して糖鎖高分子被覆シャーレを作製した。それらの糖鎖高分子被覆シャーレに、Seqlenの方法で単離したラット肝細胞の懸濁液3.5×10⁵細胞/ディッシュとなるように分注し、60分間培養した。シャーレに接着していない細胞を回収してコールターカウンターで計数することにより細胞接着率を算定した。また、培養開始と同時に、P

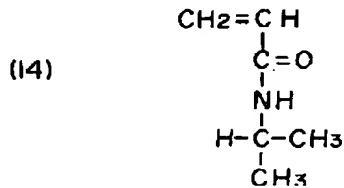
VLA、RGDSG、またはP (VLA-*c o*-RGDSG) の水溶液 (0.01% (W/V)) を添加し、細胞接着に対する阻害効果も測定した。P (VLA-*c o*-RGDSG) 不被覆シャーレでの結果を図3 (A) に、PVLA被覆シャーレでの結果を図3 (B) に示す。

【0067】阻害剤を添加しない場合には、どちらのシャーレでも70%以上の接着率を示した。阻害実験の結果、P (VLA-*c o*-RGDSG) 被覆シャーレでは、P (VLA-*c o*-RGDSG) でしか阻害されなかつたのに対し、PVLA被覆シャーレでは、PVLAによっても接着阻害された。即ち、P (VLA-*c o*-RGDSG) 被覆シャーレでの肝細胞接着は、VLAのガラクトース残基に対する認識だけでなく、第2の作用部位であるRGDSGに対する認識をも介してなされていることが示された。

【0068】(実施例4) 糖鎖含有モノマーとして、前記式(2)のVLAを合成した。ビニル系モノマーとしては、下記式(14)に示すような温度感受性基を有するイソプロピルアクリルアミド (IPAAM) を用いた。IPAAMとVLAの組成比が、9:1、8:2、7:3、4:6、及び2:8 (両者のモル数の和は0.01mol) となるように分取し、各々のモノマーに対して1mol%となるように顆粒酸カリウムを加えた。これらを2mlの水溶液とした後、60°Cで24時間共重合させて糖鎖高分子を得た。

【0069】

【化14】



【0070】上記の糖鎖高分子水溶液の Lower Critical solution Temperature (LCST) を測定した。方法は、16°C～44°Cの各種温度条件での糖鎖高分子水溶液のUV (波長400nm) 透過率の変化を測定することにより行った。その結果、IPAAM:VLA=9:1の組成比で共重合した糖鎖高分子のみにLCSTが34°Cに観測された。この9:1の共重合体を、本実施例の糖鎖高分子 (P (IPAAM-*c o*-VLA) と略記) とする。

【0071】本実施例の糖鎖高分子 (P (IPAAM-*c o*-VLA)) の各種濃度でシャーレを被覆した。Seglenらの方法に従ってラット肝細胞を単離して4×10⁴細胞/mlに調整し、前記被覆シャーレに37°Cで分注した。37°C、5%CO₂下、WE培地で2時間培養し、未接着の細胞を37°Cで回収して各被覆シャーレに対する細胞接着率を算定した。次いで、各被覆シャーレに接着した細胞に、4°Cに冷却した培地を添加し、脱着

した細胞を回収してコールターカウンターで脱着細胞数を計数した。結果を図4に示す。

【0072】10及び30mg/cm²の濃度でP (IPAAM-*c o*-VLA) を被覆したシャーレでは、80%前後の良好な接着率が得られた。また、30mg/cm²で被覆したシャーレでは、接着した細胞のほぼ全部が脱着したのに対し、10mg/cm²で被覆したシャーレでは接着した細胞の約半分しか脱着されなかつた。一方、90mg/cm²で被覆したシャーレでは、接着率及び脱着率ともに40%程度であった。

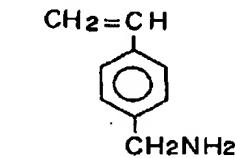
【0073】以上の結果から、ラット肝細胞は、ガラクトース残基を有し、かつ温度感受性基をも有するP (IPAAM-*c o*-VLA) に対して良好な接着を示し、接着した細胞は、4°Cの培地を添加するだけで容易に脱着できることがわかつた。ただし、これらの接着-脱着は、P (IPAAM-*c o*-VLA) の被覆濃度にも依存することがわかつた。

【0074】即ち、本実施例の糖鎖高分子は、ガラクトース残基で細胞を特異的に接着させ、肝細胞に非特異的な第2の作用部位であるIPAAMで高分子を物理的に変化させ、細胞を脱着できる。よつて、この糖鎖高分子は、細胞の選択的回収剤などとしても有効に使用できることが示唆された。

【0075】(実施例5) 糖鎖含有モノマーとして、前記式(2)のVLAを合成した。ビニル系モノマーとしては、下記式(15)に示すようなアミノ基を有するp-アミノメチルスチレンとした。これらのモノマーを、80:20のモル比で混合して共重合させ、本実施例の糖鎖高分子を得た。

30 【0076】

【化15】



【0077】本発明の糖鎖高分子とアルギン酸ナトリウムとを、水に溶解してゲル状の細胞培養基質を作製した。この細胞培養基質に肝細胞懸濁液 (30×10⁴細胞/ml) を混合し、造粒装置を用いて粒子状に加工した。

【0078】肝細胞を含む粒子状の細胞培養基質をポリスチレンシャーレに互いが接触しないように分散し、加湿した空気/CO₂ (95/5容積%) インキュベーター中に、37°Cで60分間保持した。顕微鏡観察により、培養された肝実質細胞は、適度な大きさ (約100μm) の3次元的凝集体を形成したことが確認された。

【0079】

【発明の効果】本発明の糖鎖高分子は、糖鎖によって細

胞に対する選択性が付与され、さらにビニル系モノマーによって第2の作用が付加されている。例えば、温度感受性基を有するビニル系モノマーを組み合わせれば、目的とする細胞を選択的に回収する細胞回収剤が得られる。

【0080】また、塩基性基を有するビニル系モノマーを組み合わせれば、酸性多糖類とゲル状のコンプレックスを形成でき、3次元的構造を有する細胞培養基質を得ることができる。この3次元構造を有する細胞培養基質で肝細胞を培養すれば、肝細胞の3次元的凝集体が容易に得ることができる。この細胞培養基質は、粒子化が可能であり、粒子化した細胞培養基質で肝細胞を培養することにより、立体制御された閉鎖環境の培養を行うこと*

*ができる。このような立体制御された閉鎖環境での培養した肝細胞凝集体は、そのままの形状でハイブリッド人工肝臓に好適に組み込むことができる。

【図面の簡単な説明】

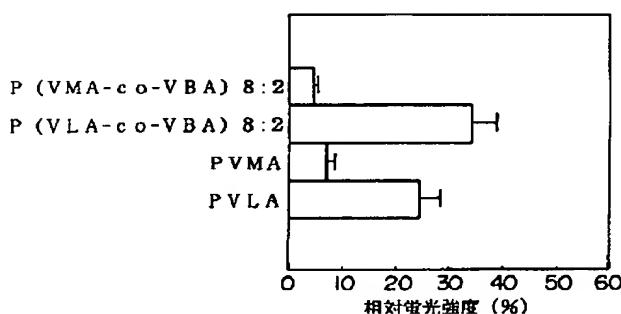
【図1】 実施例1の糖鎖高分子の癌細胞に対する認識性を示すグラフである。

【図2】 実施例2の糖鎖高分子の、MIN6細胞のインスリン産生量に対する影響を示すグラフである。

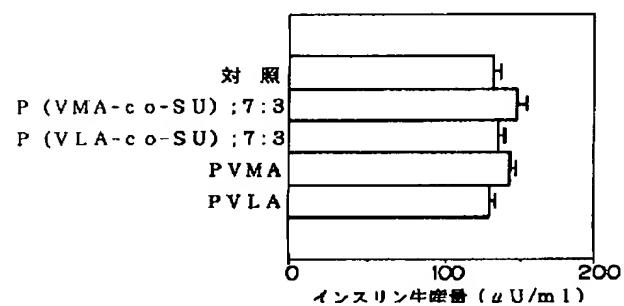
10 【図3】 実施例3の糖鎖高分子(A)及びPVLA(B)に対する肝細胞の接着性を表すグラフである。

【図4】 実施例4の糖鎖高分子の各濃度で被覆されたシャーレに対する肝細胞の接着率及び脱着率を示すグラフである。

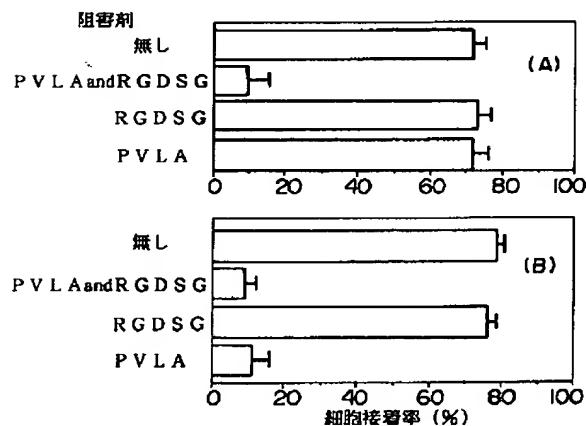
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

